DER EINFLUSS DER WASSERBEWEGUNG UND VERSCHIEDENER LIGANDEN AUF DIE CALCIUM- UND PHOSPHAT-RESORPTION AUS DEM DÜNNDARM

Wernher Theobald

1969

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität des Saarlandes

Direktor: Professor Dr. W. Rummel

DER EINFLUSS DER WASSERBEWEGUNG UND VERSCHIEDENER LIGANDEN AUF DIE CALCIUM- UND PHOSPHAT-RESORPTION AUS DEM DÜNNDARM

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der
Universität des Saarlandes

vorgelegt von
Wernher Theobald
geb. am 24. 3. 1937 in Rodalben

Dekan: Professor Dr. H. Witter

Referent: Professor Dr. K. Pfleger

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde
am 17. April 1969 abgelegt.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	METHODEN	
	1. Messung der Diffusion von Calcium, Phosphat und Rubidium in physiologischen Lösungen	5
	2. Versuche an der isoliert abgebundenen Dünndarmschlinge der Ratte	8
	3. Verwendete radioaktive Isotope und Meßmethode	11
III.	ERGEBNISSE	
	1. Diffusion von Calcium und Phosphat in Anwesenheit verschiedener Komplexbildner	18
	2. Calcium- und Phosphat-Resorption aus der abgebundenen Dünndarmschlinge der Ratte	20
IV.	DISKUSSION	29
V.	ZUSAMMENFASSUNG	38
VI.	LITERATUR	

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG

Calcium und Phosphat sind Stoffe, die für das Leben essentiell sind. Der Phosphatgehalt des Meerwassers ist so gering, daß dadurch der Vermehrung der marinen Lebewesen eine Grenze gesetzt ist. Bei den Säugetieren ist das Skelett aus Calcium und Phosphat aufgebaut, und eine bestimmte Calcium-Konzentration ist für viele Funktionen der Organe, z.B. des Nervensystems, der Muskulatur und des Herzens notwendig. Aber auch die Blutgerinnung, die Resorption aus dem Magendarmtrakt und der Stoffwechsel sind vom Calcium abhängig. Phosphat nimmt durch seine Eigenschaft, mit Adenosin energiereiche Anhydrite zu bilden, eine Schlüsselstellung im intermediären Stoffwechsel und bei der Bereitstellung der Energie ein.

Calcium und Phosphat sind in tierischen und pflanzlichen Nahrungsmitteln in stark unterschiedlichen Konzentrationen vorhanden. Der normale Erwachsene benötigt etwa 1 g Calcium und 1,5 g Phosphat pro Tag. Diese Menge ist in der heute aufgenommenen Nahrung in der Regel enthalten. Gelegentliche Störungen des Calcium-Stoffwechsels weisen aber darauf hin, daß die Calcium- und Phosphat-Resorption ein

relativ komplizierter Vorgang ist. So scheint bereits eine Änderung des Verhältnisses Calcium : Phosphat die Calcium-Resorption zu beeinflussen (1), bzw. es scheint ein optimales Verhältnis hinsichtlich der Resorption zu bestehen, wenn das Verhältnis Calcium : Phosphat 4,3 beträgt (2). Weiterhin scheinen Stoffe, die zum Teil bereits natürlicherweise in der Nahrung vorkommen, fördernd oder hemmend auf die Calcium-Resorption einzuwirken. So konnte eine verminderte Calcium-Resorption festgestellt werden, wenn Phytate in der Nahrung vorhanden waren (3). Diese Befunde wurden damals so gedeutet, daß Calcium mit Phytaten im Darm unlösliche Verbindungen eingeht, die ausfallen und so nicht resorbiert werden können. Bestimmte Zucker - Glucose, Xylose, Lactose, Fruktose, Rohrzucker, Galactose (4) - und die Aminosäure l-Lysin (5) steigern die Calcium-Resorption. Das Nahrungseiweiß scheint nicht ohne Bedeutung für die Calcium-Aufnahme zu sein. So werden die guten Zähne der Eskimos auf die gute Calcium-Resorption infolge des hohen Fleischgenusses der Eskimos zurückgeführt (6). Eine Deutung dieser Befunde ist aber erst nach genauer Kenntnis der Gesetzmäßigkeiten der Calcium-Resorption möglich.

Nach Untersuchungen, die vornehmlich auf SCHACHTER et al., R. H. WASSERMAN und H. E. HARRISON et al. (7, 8, 9, 10) zurückgehen, wird heute allgemein angenommen, daß die Calcium-Resorption ein aktiver Transport ist. Die Fähigkeit der Calcium-Ionen, mit verschiedenen Komplexbildnern Verbindungen einzugehen, kann sich gerade bei Annahme eines aktiven Prozesses unterschiedlich auswirken. So kann ein Komplexbildner dadurch, daß er Calcium im Darmlumen in Lösung hält, das Calcium-Angebot für das transportierende System erhöhen, andererseits aber auch mit dem Transportsystem um Calcium konkurrieren und so die Resorption herabsetzen.

Es wurde deshalb zunächst im Modell geprüft, ob bestimmte Stoffe in physiologischem Milieu einen Einfluß auf den physikochemischen Zustand der Calcium-Ionen haben. Eine Auswertung der bekannten Komplexbildungskonstanten zur Beantwortung dieser Frage ist nicht ohne weiteres möglich, da diese bei alleiniger Anwesenheit von Calcium-Ionen und Komplexbildnern gewonnen wurden, im Darmlumen aber ein anderes Ionenmilieu vorliegt. Einen brauchbaren Hinweis über den Zustand der Calcium-Ionen bot hier die Bestimmung der Diffusion von Calcium in physiologischen Lösungen.

Eine Komplexbildung des Calciums sollte sich als eine Verminderung der Diffusionsgeschwindigkeit anzeigen.

Anschließend wurde die Calcium- und Phosphat-Resorption in Anwesenheit von verschiedenen Komplexbildnern aus der abgebundenen Schlinge des oberen Jejunum der Ratte studiert. Dieser Darmabschnitt wurde gewählt, da in diesem Darmabschnitt die Calcium-Resorption vornehmlich stattfinden soll (11, 12, 13). Gleichzeitig wurde hierbei die Phosphat-Resorption gemessen, da die Abhängigkeit der Calcium-Resorption von der gleichzeitig anwesenden Phosphat-Menge die Frage nach einer Kopplung zwischen Calcium- und Phosphat-Resorption stellte.

Da USSING nachgewiesen hatte, daß sich eine Wasserverschiebung durch eine resorbierende Membran positiv oder negativ auf die Resorption von gelösten Stoffen auswirken kann und Untersuchungen von FORTH, PFLEGER und RUMMEL (14) gezeigt hatten, daß sich eine Wasserverschiebung aus dem Darm ins Blut fördernd auf die Resorption von Alkalimetallen und bestimmten Arzneistoffen auswirkt, wurde auch der Einfluß der Wasserverschiebung auf die Calcium- und Phosphat-Resorption geprüft.

II. METHODEN

1. Messung der Diffusion von Calcium, Phosphat und Rubidium in physiologischen Lösungen

Die Messung der Diffusion von Stoffen in wässrigen Lösungen ist technisch äußerst schwierig, da die durch geringe Temperaturänderungen oder Erschütterungen des Meßsystems auftretende Konvektion die Ergebnisse wesentlich verfälscht. Zur Vermeidung dieses Fehlers sind sehr sinnvolle Verfahren ausgearbeitet worden, deren Auswertung allerdings noch einer relativ komplizierten, mathematischen Analyse bedarf.

Für die vorliegenden Untersuchungen reicht die Kenntnis der relativen Diffusionsgeschwindigkeit, d.h. wie schnell Calcium diffundiert im Vergleich zu einem anderen Stoff, dessen Diffusionsgeschwindigkeit bekannt ist, vollständig aus. Es war deshalb möglich, die sich aus der Konvektion ergebenden technischen Probleme dadurch zu überwinden, daß die Diffusion von Calcium durch eine von Kanälen durchzogene Membran studiert wurde, durch die eine Konvektion verhindert wird. Die Kollodiummembran erschien hier ge-

eignet. Sie besitzt eine Dicke von ca. 0,05 mm und die Poren sind ca. 50 Å weit. Als Vergleichsstoff wurde das Rubidium-Ion gewählt, da es als Alkalimetall in physiologischen Lösungen mit anderen Stoffen nur vollständig dissoziierte Salze bildet und sein Durchtritt durch die Darmwand bereits untersucht war. Weiterhin läßt sich dieses Ion leicht neben Calcium messen.

Zum Studium der Dialyse wurde die in Abb. 1 dargestellte Apparatur verwendet. Die beschriebene Apparatur wurde mit Hilfe eines Elektromotors 4 mal/Min um die Längsachse gedreht, so daß eine ausreichende Durchmischung der Kammern zu beiden Seiten der Membran gewährleistet war.

Als Dialysiermembran wurde die Kollodiummembran DEXSTAR verwendet. Die Abdichtung gewährleisteten Silikondichtungen der Firma Membranfiltergesellschaft, Göttingen, in Verbindung mit der Ultrafiltrationsvorrichtung, die von der gleichen Firma vertrieben wird.

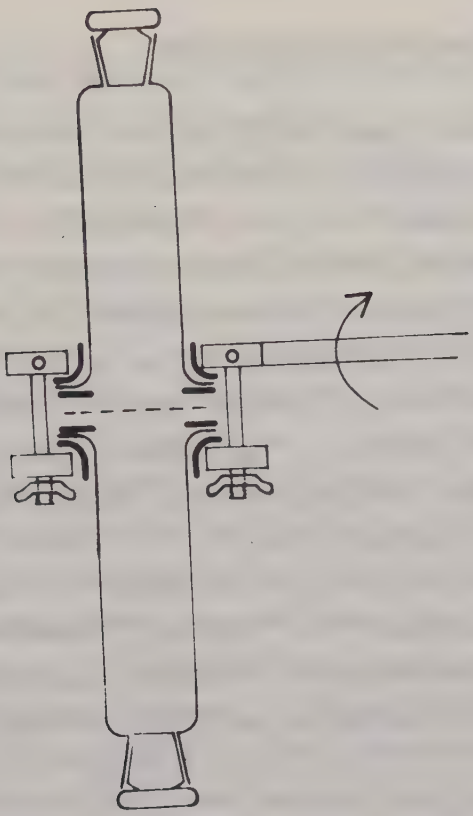


Abbildung 1

Durchführung der Dialyseversuche

In beide Kammern wurden je 10 ml isotone Cholin-Chlorid-Lösung bzw. Tyrode-Lösung folgender Zusammensetzung gegeben: 8,0 g NaCl, 0,34 g KCl, 2,1 g $NaHCO_3$, 0,016 g KH_2PO_4 und 2,0 g Glucose pro Liter. Nach Auflösen der genannten Substanzen wurden 1,2 µMol $MgCl_2$, 1 µMol Calcium und Phosphat/ml zugesetzt. Zu Versuchsbeginn wurde in eine der Kammern (= Kammer A) 0,4 µC ^{45}Ca und 0,4 µC ^{86}Rb gegeben. In einem Teil der Versuche wurde anstelle von ^{86}Rb das Phosphor-Isotop ^{32}P zugegeben. Nach 20, 40, 60 und 90 Minuten wurden jeweils 0,5 ml aus Kammer B entnommen und das übergetretene ^{45}Ca, ^{86}Rb bzw. ^{32}P bestimmt. Um unnötige Berechnungen zu vermeiden, wurde das Volumen der Seite A gleichzeitig um 0,5 ml verringert.

2. Versuche an der isoliert abgebundenen Dünndarmschlinge der Ratte

Für die Untersuchungen wurden Ratten von 180 g Gewicht verwendet. In Äthernarkose wurde durch einen Scherenschnitt durch die Linea alba die Bauchhöhle

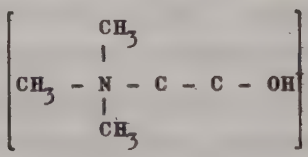
eröffnet und etwa 2 cm unterhalb der Flexura duodenojejunalis eine lose Schlaufe mit 0,5 mm dickem Nähfaden gelegt. Sodann wurde von dieser Stelle mit Hilfe eines PVC-Stäbchens eine 12 cm lange Jejunumschlinge abgemessen und mit Nähfaden abgebunden. Anschließend wurde etwa 1 cm oberhalb der oberen Schlaufe die Kanüle (Nr. 14) einer Injektionsspritze, die 2 ml Testlösung enthielt, ins Darmlumen eingestochen, so daß die Spitze der Kanüle in den abgebundenen Teil der Schlinge zu liegen kam. Die Schlaufe wurde dann von einer Hilfsperson fest über der Kanüle zugezogen und der Spritzeninhalt (2 ml) in die Schlinge injiziert. Anschließend wurde die Kanüle unter weiterem Zuziehen der Schlaufe zurückgezogen und fest abgebunden. Bei diesem Vorgehen tritt keine Flüssigkeit in den oberen Darmabschnitt zurück. Anschließend wurde die Bauchhöhle durch eine Naht der Linea alba wie durch Klammern der Bauchhaut wieder verschlossen und die Äthernarkose abgebrochen. Die Tiere wurden dann nach verschiedenen Zeiten durch Einbringen in eine hochprozentige Ätheratmosphäre schnell getötet und die abgebundenen Darmschlingen durch Abtrennung vom Mesenterium entnommen. Nach Reinigung von anhaftendem Blut mit physiologischer Kochsalzlösung und vorsichtigem Abtrocknen mit Filtrierpapier wurden die Darm-

schlingen einseitig eröffnet und der Schlingeninhalt, wie die vorsichtig ausgestrichenen Schlingen selbst, in vorher abgewogene Reagenzgläser zur weiteren Analyse gegeben.

Verwendete Testlösungen

a) Versuche ohne Wasserverschiebung aus dem Darm

Für diese Versuche eignet sich Cholin-Chlorid in destilliertem Wasser, das als quarternäre Ammoniumbase



kaum aus dem Darmlumen resorbiert wird. 2 ml dieser Lösung wurden 1 µMol $CaCl_2$, 1 µMol RbCl und 1 µMol Na_2HPO_4 zugesetzt, die mit 6 µC ^{45}Ca, 0,6 µC ^{86}Rb, in einem Teil der Versuche mit 0,5 µC ^{32}P anmarkiert waren.

b) Versuche zum Studium des Einflusses der Wasserverschiebung auf die Calcium- und Phosphat-Resorption

Bei diesen Versuchen wurde ein Teil des Cholinchlorids durch Kochsalz ersetzt. Calcium, Rubidium usw. wie die Isotope wurden in den unter a) angegebenen Mengen zugegeben.

3. Verwendete radioaktive Isotope und Meßmethode

Für die Untersuchungen wurden folgende Isotope verwendet:

a) ^{45}Ca als Chlorid

Dieses Calcium-Isotop ist ein weicher Beta-Strahler von einer Energie von 0,25 MeV mit einer Halbwertszeit von 164 Tagen. Es wird im Neutronenstrom des Reaktors durch einen n,γ-Prozeß gebildet und wurde uns mit einer spezifischen Aktivität von 5 C/g Calcium = 5 μC/γ Calcium aus Amersham (England) geliefert.

b) ^{86}Rb als Chlorid

Dieses Isotop hat sowohl Beta-Strahlung von 1,08 MeV als auch 9 % γ-Strahlung von 1,08 MeV. Die Halbwertszeit beträgt 18,7 Tage. Es wird ebenfalls im Reaktor durch einen n,γ-Prozeß aus ^{85}Rb erhalten und mit einer spezifischen Aktivität von 100 mC/g Rubidium ebenfalls aus Amersham geliefert.

c) ^{32}P als Phosphat

Radioaktiver Phosphor hat eine relativ harte Beta-Strahlung von 1,7 MeV. Die Halbwertszeit beträgt 14,2 Tage. Es wird im Reaktor mit langsamen

Neutronen aus ^{32}S durch eine n,p-Reaktion gewonnen, mit einem Verfahren, das die Gewinnung von trägerfreiem ^{32}P erlaubt. In dieser Form wurde es uns aus Amersham geliefert.

Meßmethode

Ziel der Untersuchungen war, die Abnahme oder Zunahme von Calcium in einem Experiment mit der von Rubidium oder Phosphat zu vergleichen. Um individuelle Schwankungen besonders bei den Tierversuchen auszuschalten, war es erstrebenswert, Calcium zusammen mit der Vergleichssubstanz möglichst in der gleichen Probe zu messen. Da ^{45}Calcium und ^{32}Phosphor keine Gamma-Strahlung besitzen, kam nur die Szintillationsmessung mit einem flüssigen Szintillator in Betracht, wie er für die Messung von Radiokohlenstoff und Tritium entwickelt worden ist und dafür häufig angewandt wird. Als Meßgerät stand ein TRICARB, Modell 3002, der Firma Packard Instruments, USA, zur Verfügung.

Prinzip der Messung

Zerfällt ein ^{45}Ca- oder ^{86}Rb-Atom in der Szintillatorflüssigkeit der Probe, so wird die Energie der Beta-Strahlung durch die in der Szintillatorflüssigkeit vorhandenen Szintillatoren in sehr kurze Lichtblitze umgesetzt, die von den zu beiden Seiten der Probe befindlichen Photomultipliern in elektrische Ströme von der Dauer der Lichtblitze, d.h. Impulse, umgesetzt werden. Die Impulshöhe hängt von der umgesetzten Energie, d.h. von der Energie der Beta-Strahlung, ab. Sie ist so bei ^{45}Calcium, dessen Beta-Strahlung nur eine Energie von 0,25 MeV besitzt, niedriger als bei ^{86}Rubidium, das eine energiereiche Beta-Strahlung von 1,08 MeV besitzt. Diese Impulse werden nun einem 2-Kanal-Diskriminator zugeleitet, der mit Hilfe eines einstellbaren "Fensters" nur Impulse einer bestimmten Größe hindurchläßt und einem Zähler zuleitet. Da der verwendete Zähler (TRICARB, Modell 3002) zwei Kanäle besaß, konnten so ^{45}Calcium und ^{86}Rubidium bzw. ^{32}Phosphor in der gleichen Probe gemessen werden (Abb. 2).

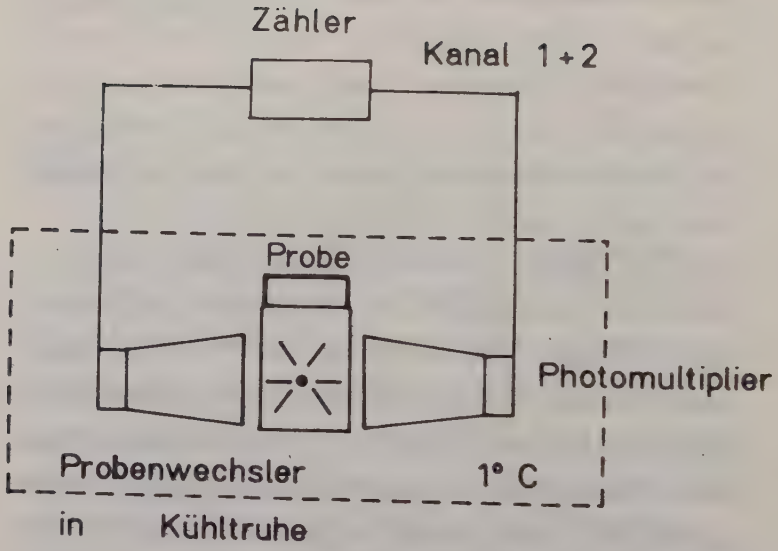


Abbildung 2

Die Abbildung 2 zeigt das Prinzip des Zählgerätes.

Ein Nachteil der Verwendung flüssiger Szintillatoren ist allerdings, daß die Compton-Strahlung, die zur Messung gelangt, energetisch nicht scharf begrenzt ist und so ein Isotop in der Regel auch in den Kanal des 2. Isotops einstrahlt. Dieser Nachteil konnte bei den vorliegenden Messungen durch Begrenzung der "Fensterbreite" und Wahl des Mischungsverhältnisses der verwendeten Isotope

$$\frac{\mu C \text{ Isotop mit härterer Strahlung}}{\mu C \text{ Isotop mit weicher Strahlung}} = 1/10$$

weitgehend ausgeschaltet werden und wurde zusätzlich mit Eichfaktoren, die durch Messung eines Isotops allein gefunden wurden, korrigiert.

Bei der verwendeten Einstellung des Geräts strahlte ^{32}Phosphat mit 23 % der im "Phosphatkanal" gefundenen Impulse in ^{45}Calcium ein und ^{86}Rubidium mit 31,5 %. ^{45}Calcium beeinflußte die Zählung von ^{86}Rubidium und ^{32}Phosphor nicht.

Ein zweiter Nachteil der Verwendung flüssiger Szintillatoren ist der sogenannte Quench-Effekt durch Fremdsubstanzen, die unvermeidbar mit den zu messen-

den Proben in die Szintillatorflüssigkeit eingebracht werden. Diese Schwierigkeit wurde bei den vorliegenden Messungen dadurch umgangen, daß alle Proben die gleichen Fremdsubstanzen enthielten, z.B. durch Verwendung von nichtradioaktiven Organextrakten, denen eine bekannte Menge Radioaktivität zugesetzt wurde. Die Messungen wurden schließlich noch durch Beimischung bekannter Isotopenmengen zu bereits gemessenen Proben (Innerer Standard) überprüft.

Szintillatorflüssigkeit

n. G. A. BRAY, Analytical Biochemistry 1, No. 4 - 5, 279 - 285 (1960)

Naphthalin	60,0 g
PPO	4,0 g
POPOP	200,0 mg
Methanol	100,0 ml
Äthylenglycol	20,0 ml
Dioxan ad	1000,0 ml

10 ml dieser Lösung wurden mit Hilfe einer Injektionsspritze so zu 1 ml der zu untersuchenden Lösung gegeben, daß eine sofortige Mischung eintrat.

Vorbereitung der verschiedenen Meßproben

a) 0,5 ml der bei den Diffusionsversuchen gewonnenen Proben wurden direkt in die Meßgläschen gegeben und mit Szintillatorflüssigkeit gemischt.

b) 2 ml Darminhalt wurden mit 3 ml n/10 HCl gemischt und 5 Min. abzentrifugiert. Dabei setzten sich geringe Reste Darminhalt ab. 0,2 ml des Überstandes wurden in Meßgläschen gegeben, mit 0,8 ml Wasser verdünnt und mit Szintillator gemischt.

c) Die herausgenommenen Darmschlingen wurden in 5 ml n/10 HCl 15 Min. bei 80^{o} C erhitzt und dann 5 Min. abzentrifugiert. Durch das Erhitzen mit verdünnter Säure gehen alle Metalle und evtl. in ATP eingebautes ^{32}P in Lösung. 0,2 ml des Überstandes wurden anschließend mit 0,8 ml Wasser verdünnt und mit Szintillator gemischt.

Alle Proben wurden eine ausreichend lange Zeit, d.h. mindestens 1000 Impulse in jedem Kanal, in der Regel 1 - 10 Min. gemessen.

III. ERGEBNISSE

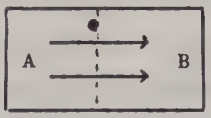
1. Diffusion von Calcium und Phosphat in Anwesenheit verschiedener Komplexbildner

Das Ergebnis der Diffusionsversuche ist in Tab. 1 wiedergegeben. Um von Änderungen der Versuchsbedingungen, z.B. durch Änderung der Porengröße durch Quellen der verwendeten Dialysiermembran oder Temperaturschwankungen, unabhängig zu sein, wurde gleichzeitig die Diffusion eines neben ^{45}Calcium leicht bestimmbaren Alkalimetalls - nämlich ^{86}Rubidium - als Indikator mitverfolgt, das darüber hinaus noch den Vorteil bietet, mit keinem der verwendeten Komplexbildner unter den gegebenen Versuchsbedingungen Verbindungen einzugehen. Der Übersichtlichkeit halber werden die Mittelwerte, die sich aus der Relation des von A → B übergetretenen Rubidium zum Calcium verglichen. Ein Ansteigen der Relation gegenüber dem Kontrollwert ist mit einer Verlangsamung der Calcium-Diffusion, d.h. Komplexbildung, gleichzusetzen.

Tabelle 1

Diffusion von Ca^{++} und Rb^{+} durch eine Kollodiummembran unter dem Einfluß verschiedener Komplexbildner

(je 1 µMol $^{45}Ca^{++}$, $^{32}PO_4^{---}$ oder ^{86}Rb pro ml, alle Versuche wurden an der gleichen Membran durchgeführt)



Diffusionsrichtung

% von A in B (A markiert, B gemessen)

	nach Minuten	Cholin-Cl	Kaninchen-serum	Tyrode	Tyrode + Na-Zitrat 50 x	Tyrode + EDTA 10 x	Tyrode + Na-Phosphat 10 x	Tyrode + Na-Glukonat 10 x	Vergleich von Ca u. P		
Ca^{++}	20	2,02	1,82	2,72	1,47	1,58	1,43	2,8	5,1	3,9	
	40	4,56	3,82	5,40	4,02	3,69	3,25	5,17	8,2	6,5	Ca^{++}
	60	6,87	5,92	8,23	5,84	6,19	5,69	8,36	11,4	9,7	
	90	12,22	9,36	12,51	9,42	9,08	9,29	12,47	17,4	14,6	
Rb^{+}	20	5,35	6,36	6,76	5,92	8,64	7,41	6,84	5,7	4,5	
	40	10,29	12,76	14,54	13,25	17,06	14,85	13,45	8,9	7,6	
	60	18,17	21,66	18,22	21,02	23,96	21,49	19,36	12,4	11,1	PO_4^{---}
	90	24,39	27,15	27,60	29,88	32,85	30,79	29,35	18,2	16,7	

	Rb^{+} : Ca^{++}							PO_4^{---} : Ca^{++}	
20	2,65	3,49	2,49	4,02	5,47	5,18	2,44	1,11	1,15
40	2,26	3,34	2,51	3,29	4,62	4,56	2,6	1,08	1,21
60	2,64	3,65	2,21	3,6	3,87	3,77	2,31	1,08	1,14
90	2,0	2,90	2,20	3,17	3,62	3,31	2,35	1,04	1,14
Mittelwerte:	2,30 ±0,3	3,33 ±0,47	2,35 ±0,22	3,52 ±0,37	4,39 ±0,83	4,20 ±0,83	2,43 ±0,14	1,07 ±0,1	1,16 ±0,02

Jede Zahl ist der Mittelwert aus 4 Einzelbestimmungen.

Die Versuche (Tab. 1) zeigen, daß es sicher belanglos ist, ob Calcium in einer isotonen Cholin-Cl- oder Tyrode-Lösung diffundiert, die bei einem pH-Wert von 7,4 Phosphat, Carbonat und Glucose enthält, deren Einfluß auf die Calcium-Diffusion untersucht werden sollte. Serum setzt, als Folge der Bindung von Calcium an Eiweiß, die Diffusionsrate um 1/3 herab. Stärker wirksam ist Citrat (50-facher Überschuß von Komplexbildner), EDTA (10-facher Überschuß) und Phosphat bei einem 10-fachen Überschuß, während Gluconat (10-facher Überschuß) ohne Einfluß auf die Calcium-Diffusion ist.

Die beiden letzten Spalten der Tab. 1 zeigen, daß Calcium und Phosphat etwa gleich schnell in Tyrode-Lösung diffundieren.

2. Calcium- und Phosphat-Resorption aus der abgebundenen Dünndarmschlinge der Ratte

a) Resorption von Calcium und Phosphat

Die Calcium- und Phosphat-Resorption aus der abgebundenen Jejunumschlinge der Ratte ist in Tab. 2 wiedergegeben. Bei einem Angebot von je 1 µMol/ml

Tabelle 2

Calcium- und Phosphat-Resorption aus der abgebundenen Dünndarmschlinge der Ratte in % des Angebots

	Angebot in 2 ml Cholin-Cl-Lösung			
	2 µMol Ca 2 µMol P		20 µMol Ca 2 µMol P	2 µMol Ca 20 µMol P
nach Minuten	20	60	60	60
resorbiert von:				
Ca^{++}	18,8 ± 9,2	47,3 ± 8,2	21,8 ± 1,7	29,0 ± 3,7
PO_4^{---}	47,4 ± 22,3	85,5 ± 9,5	85,4 ± 7,2	67,3 ± 7,3
in die Darmwand aufgenommen von:				
Ca^{++}	6,5 ± 1,7	4,2 ± 1,0	-*	3,1 ± 1,0
PO_4^{---}	26,8 ± 14,6	53,3 ± 8,9	42,0 ± 8,6	14,2 ± 1,2

n = 5

* = ^{45}Ca nicht meßbar

Calcium und Phosphat sind nach 20 Minuten 19 % des Calciums und 48 % des Phosphates aus dem Darmlumen verschwunden. Nach 60 Minuten sind 47 % Calcium und 85 % Phosphat aus dem Darmlumen ausgetreten. 1/3 des verschwundenen Calciums und die Hälfte des Phosphates befinden sich nach 20 Minuten noch in der Darmwand selbst. Nach 60 Minuten hat das ^{45}Ca - also das aus dem Darmlumen stammende Calcium - in der Darmwand von 6,5 auf 4,3 % abgenommen, das Phosphat hingegen hat noch weiter zugenommen. 2/3 des aus dem Darmlumen verschwundenen Phosphates sind nunmehr in der Darmwand zu finden.

Eine 10-fache Erhöhung des Calcium-Angebotes führt zu einer Verminderung der Calcium-Resorption auf etwa die Hälfte. Die Phosphat-Aufnahme bleibt dabei unverändert. In der Darmwand selbst konnte bei diesem hohen Calcium-Angebot - als Folge der verminderten spezifischen Aktivität - kein ^{45}Ca nachgewiesen werden, d.h. es wurde in die Darmwand weit weniger Calcium aufgenommen als der nur auf die Hälfte herabgesetzten Calcium-Resorption entspricht. Die Phosphat-Aufnahme in die Darmwand wird durch das hohe Calcium-Angebot kaum vermindert. Eine 10-fache Erhöhung des Phosphat-Angebotes setzt die

Phosphat-Resorption dagegen nur geringgradig herab, die Calcium-Resorption wird dabei vermindert. Die Phosphat-Aufnahme in die Darmwand ist auf 1/3 herabgesetzt.

b) Der Einfluß von Komplexbildnern auf die Calcium- und Phosphat-Resorption

Vergleicht man die Resorption von Calcium in Anwesenheit der verschiedenen Komplexbildner mit der Resorption ohne diese Komplexbildner (Tab. 3), so stellt man fest, daß keiner der geprüften Komplexbildner die Calcium-Resorption fördert, sondern in der Regel hemmt. Die stärkste Hemmwirkung zeigt die Äthylendiamintetraessigsäure. Setzt man die Calcium-Resorption der Kontrollen gleich 100 %, so ist in Anwesenheit von EDTA die Calcium-Resorption auf 60 % herabgesetzt. Gluconat hemmt bei einem 10-fachen Überschuß die Calcium-Resorption noch nicht. Die Hemmung durch Citrat und Lactat läßt sich durch Erhöhung des Komplexbildnerüberschusses weiter verstärken. Ein 10-facher Überschuß von Pyrophosphat hemmt die Calcium-Resorption, während bei einer weiteren Erhöhung der Pyrophosphatkonzentration die Hemmwirkung wieder abzunehmen scheint.

Tabelle 3

Calcium- und Phosphat-Resorption aus der abgebundenen Dünndarmschlinge der Ratte in % des Angebots nach 60 Minuten

(Angebot: je 2 µMol Ca und PO_4/2 ml Cholin-Cl. Der molare Überschuß der Komplexbildner ist angegeben.)

	Kontrollen	* EDTA 10x	EDTA 10x	Gluconat 10x	Lactat 10x	Zitrat 10x	Pyrophosphat 10x	Persantin 10^{-4}	Lactat 50x	Zitrat 50x	Gluconat 50x	Pyrophosphat 50x
Aus dem Darmlumen resorbiert:												
Ca	47,3 ±8,2	5,1 ±2,6	28,4 ±2,3	46,1 ±5,8	39,4 ±8,2	38,9 ±6,9	36,9 ±3,2	46,8 ±15,1	34,8 ±4,1	22,7 ±2,1	37,1 ±9,4	45,0 ±5,6
PO_4	85,5 ±9,5	70,7 ±14,4	93,4 ±2,6	90,4 ±1,1	91,3 ±1,2	91,2 ±2,5	78,3 ±8,7	93,6 ±0,9	83,4 ±3,9	87,7 ±4,0	90,8 ±4,2	63,3 ±2,6
In die Darmwand aufgenommen:												
Ca	4,2 ±1,0	7,2 ±4,6	8,8 ±2,8	10,9 ±1,4	3,6 ±1,0	6,3 ±0,7	5,0 ±0,7	7,3 ±2,4	3,2 ±0,7	5,9 ±1,2	3,9 ±0,6	4,6 ±0,9
PO_4	53,3 ±8,9	40,9 ±9,4	32,0 ±6,6	46,3 ±2,4	39,8 ±4,0	42,5 ±5,2	15,1 ±0,1	50,8 ±5,4	44,6 ±6,6	32,6 ±4,7	46,3 ±1,4	7,5 ±0,2

* = Resorption nach 20 Minuten n = 5 ± = σ

Komplexbildner, die die Calcium-Resorption hemmen, können einen fördernden Einfluß auf das Verschwinden von Phosphat aus dem Darmlumen ausüben. So ist nach 20 Minuten in Anwesenheit von EDTA fast doppelt soviel Phosphat als bei den Kontrollen aus dem Darmlumen ausgetreten. Leider stehen bei den übrigen Komplexbildnern nur 60-Minuten-Werte und keine vergleichbar kurze Zeiten zur Verfügung, die diesen Unterschied signifikant hervortreten lassen. Eine verständliche Ausnahme macht lediglich die Erhöhung des Phosphat-Angebotes (letzte Spalte der Tabelle 2) und Pyrophosphat (Tab. 3).

Die Calcium-Aufnahme in die Darmwand wird ebenfalls durch Komplexbildner beeinflußt. Sie ist nach 60 Minuten in Anwesenheit von Lactat geringgradig erniedrigt, bei EDTA aber erhöht.

Im Gegensatz zum Verhalten des Phosphat-Gehaltes im Darmlumen, der bei einer Hemmung der Calcium-Resorption durch Komplexbildner schneller abnimmt, wird die Phosphat-Aufnahme in die Darmwand durch alle Komplexbildner etwa in gleichem Maße vermindert wie die Calcium-Resorption reduziert wurde. Die stärkste Reduktion der Phosphat-Aufnahme wird durch EDTA und Zitronensäure

(50-facher Uberschuß) bewirkt. Jede Erhöhung des Phosphat-Angebotes führt zu einer Verminderung der ^{32}P-Phosphat-Aufnahme in die Darmwand.

Persantin wurde mit in diese Untersuchungen einbezogen, da von ihm bekannt ist, daß es am Erythrozyten die Phosphat-Aufnahme hemmt (GERLACH, DEUTIKE und DUHM, 19), ohne andere Durchtrittsvorgänge, z.B. die von Alkali-Ionen (PFLEGER, 16) zu beeinflussen. Über eine Beeinflussung der Phosphat-Resorption aus dem Darm war noch nichts bekannt. Wie die Tab. 3 zeigt, wird durch Persantin die Resorption von Phosphat nicht beeinflußt.

c) Der Einfluß einer Wasserverschiebung auf die Calcium- und Phosphat-Resorption

Der Darminhalt im Dünndarm ist durch den leichten Austausch von Natrium zwischen Darmlumen und Blut nahezu isoton. Wird eine isotone Lösung in das Darmlumen gebracht, deren Isotonie mit Hilfe eines Stoffes hergestellt ist, der nicht oder nur schlecht resorbiert wird, so kommt es zu einer umgekehrten Wasserverschiebung aus dem Blut in das Darmlumen.

Durch teilweisen Ersatz des zur Isotonie notwendigen Natrium in der im Darmlumen angebotenen Lösung hat man also die Möglichkeit, die Wasserverschiebung zu beeinflussen. Als geeigneter Stoff, der kaum resorbiert wird, wurde Cholin-Chlorid in Kombination mit NaCl verwendet.

Wie die Tabelle 4 zeigt, erhöht sich der Darminhalt bei Angebot einer reinen Cholin-Cl-Lösung von 2,0 auf 2,86 ml. Bei 50 % Ersatz des Natriums kommt es zu keiner Wasserverschiebung und bei Angebot einer isotonen NaCl-Lösung werden in 60 Minuten etwa 45 % des angebotenen Flüssigkeitsvolumens resorbiert.

Während die Phosphat-Resorption durch eine Wasserbewegung in das Darmlumen hinein vermindert wird und mit einer Wasserverschiebung aus dem Darm heraus ansteigt, hat die Wasserverschiebung k e i n e n Einfluß auf die insgesamt resorbierte Calcium-Menge. Die Aufnahme von Phosphat und Calcium in die Darmwand selbst ist von der Wasserverschiebung unbeeinflußt.

Tabelle 4

Der Einfluß der Wasserverschiebung auf die Calcium- und Phosphat-Resorption aus der abgebundenen Dünndarmschlinge der Ratte

(Die Wasserverschiebung wurde durch Austausch von NaCl durch Cholin-Cl in der angebotenen Lösung bewirkt. Angeboten wurden 2 µMol Calcium und 2 µMol Phosphat in 2 ml, markiert mit ^{45}Ca und ^{32}P.)

Isotonie in der angebotenen Lösung		ml am Versuchsende	resorbiert nach 60 min in % des Angebotes		in der Darmwand in % des Angebotes	
%NaCl	%Cholin-Cl		Ca^{++}	PO_4^{---}	Ca^{++}	PO_4^{---}
0	100	2,9 ±0,02	29,0 ±8,5	82,0 ±5,4	3,3 ±1,4	38,4 ±6,2
25	75	2,3 ±0,35	32,1 ±9,2	92,3 ±2,0	3,4 ±0,9	44,4 ±3,1
50	50	2,0 ±0,39	27,9 ±3,2	92,5 ±2,1	3,1 ±0,2	45,6 ±0,8
75	25	1,7 ±0,15	25,0 ±3,0	95,4 ±0,6	2,5 ±0,6	45,4 ±2,5
100	0	1,1 ±0,12	29,6 ±4,1	97,9 ±0,6	2,6 ±0,8	39,7 ±3,0

IV. DISKUSSION

Aus den Diffusionsversuchen geht hervor, daß Calcium und Phosphat in einem Milieu, das im pH-Wert und der Ionenzusammensetzung weitgehend der Zusammensetzung des Blutserums entspricht, in ionisierter Form vorliegen. Es ergaben sich nämlich keine Unterschiede in der Diffusionsgeschwindigkeit der beiden Stoffe in Tyrode-Lösung und isotoner Cholin-Cl-Lösung. Auch der Glucosegehalt der verwendeten Tyrode-Lösung von 200 mg%, der einem 10-fachen molaren Überschuß - bezogen auf den Calcium-Gehalt - entspricht, ist ohne Einfluß auf die Diffusionsgeschwindigkeit, d.h. es ist unwahrscheinlich, daß ein Zucker-Calcium-Komplex vorliegt. Diese Feststellung ist deshalb von Bedeutung, da die eingangs zitierten Untersuchungen gezeigt hatten, daß die Calcium-Resorption durch bestimmte Zucker gesteigert werden kann. Infolge der Eiweißbindung diffundiert Calcium langsamer in Gegenwart von Kaninchenserum. Die verlangsamte Diffusion in Tyrode-Lösung, die zusätzlich einen Überschuß von EDTA oder Zitrat enthielt, zeigt eine Komplexbildung von Calcium mit den beiden Stoffen an, was bedeutet, daß die Calcium-EDTA- bzw. Zitratkomplexe

auch in einem physiologischen Milieu stabil sind, was für den Komplex mit der Gluconsäure nicht zutrifft.

Ein 10-facher Überschuß von Orthophosphat vermindert die Calcium-Diffusion ebenfalls. Ob hierfür eine nicht sichtbare Aggregation von Calcium-Phosphat infolge Uberschreiten des Löslichkeitsproduktes vorliegt, kann nicht ausgeschlossen werden.

Nach physikochemischen Gesetzen sollten sich die Diffusionsgeschwindigkeiten reziprok der Wurzel aus dem Molekulargewicht verhalten, d.h.

$$D_1 = k \cdot \frac{1}{\sqrt{Mg_1}}$$

$$D_2 = k \cdot \frac{1}{\sqrt{Mg_2}}$$

$$\frac{D_1}{D_2} = \frac{\sqrt{Mg_2}}{\sqrt{Mg_1}}$$

D_1, D_2 = Diffusionsgeschwindigkeit der Substanz$_1$ bzw. der Substanz$_2$

Mg_1, Mg_2 = Molekulargewicht der Substanz$_1$ bzw. der Substanz$_2$

k = Proportionalitätskonstante

Die gefundenen Relationen Rb^+/Ca^{++}, PO_4^{---}/Ca^{++} oder Ca^{++} ohne Komplexbildner/Ca^{++} mit Komplexbildner stimmen nicht mit den nach der angegebenen Formel zu errechnenden Werten überein. Dies ist darauf zurückzuführen, daß Ca^{++}, Rb^+ und Phosphat in wässrigem Milieu von einem unterschiedlichen Hydratationsmantel umgeben sind, der sich bei der Komplexbildung zusätzlich ändert.

Calcium-Ionen diffundieren im wässrigen Milieu fast gleich schnell wie Phosphat. Die Kenntnis dieses Wertes ist deshalb zur Beurteilung der Calcium-Phosphat-Resorption von Bedeutung, da Untersuchungen von PFLEGER, FORTH und RUMMEL gezeigt hatten, daß die Alkalimetalle Na, K, Rb und Ca im Verhältnis ihrer Diffusionsgeschwindigkeiten aus dem Darmlumen austreten (14).

Die Resorptionsstudien aus der abgebundenen Dünndarmschlinge der Ratten ergaben, daß aus einer 12 cm langen Jejunumschlinge aus 2 ml isotoner Cholin-Cl-Lösung in 60 Minuten ca. 50 % des angebotenen Calciums und in 20 Minuten 50 % des Phosphates resorbiert werden (Tab. 2 und 3), d.h. Phosphat wird 3 mal schneller resorbiert als Calcium. Ließ die eingangs zitierte Be-

obachtung, daß ein Calcium-Phosphat-Verhältnis von 4,3 : 1 die Calcium-Resorption am günstigsten beeinflußt, einen stöchiometrischen Zusammenhang zwischen Calcium- und Phosphat-Resorption vermuten, so spricht dieser Befund dagegen.

Die Abb. 3 stellt die normale Calcium-Phosphat-Resorption, d.h. ohne Komplexbildner, sowie die Versuche mit der EDTA in logarithmischem Ordinatenmaßstab dar. Die Kurven sind weder für die Calcium- noch für die Phosphat-Resorption linear und zeigen eine Verminderung der Resorptionsrate mit der Zeit an. Sie ist zumindest beim Phosphat dadurch bedingt, daß das Volumen in der Darmschlinge nach 60 Minuten von 2,0 auf 2,86 ml ansteigt und die Phosphat-Resorption durch eine Wasserverschiebung mit beeinflußt wird, wie später noch diskutiert wird.

Die Abbildung zeigt deutlich, daß der Komplexbildner EDTA die Calcium-Resorption auf die Hälfte herabsetzt, aber gleichzeitig die Phosphat-Resorption etwa um den gleichen Betrag steigert. Es scheint somit bewiesen zu sein, daß durch die Bereitstellung von mehr Calcium durch die Verbesserung der Löslichkeit mit Hilfe von Komplexbildnern das Einschleusen

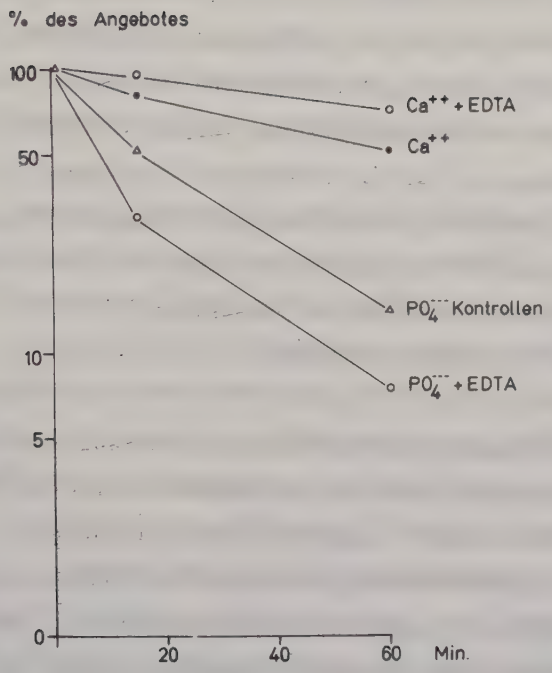


Abbildung 3

Calcium- und Phosphat-Resorption aus der abgebundenen Dünndarmschlinge der Ratte

(Die Werte sind Tabelle 2 und 3 entnommen.)

von Calcium in den Organismus nicht verbessert wird. Offensichtlich ist es - ganz ähnlich wie bei der Eisen-Resorption - auch für das Calcium-resorbierende System der Mucosa nicht ohne weiteres möglich, die Calcium-Ionen aus der EDTA-Bindung zu übernehmen. Das gleiche gilt auch für Zitronensäure und Lactat, also Stoffe, die in pharmazeutischen Präparationen zur Verbesserung der Calcium-Resorption Verwendung finden. Das ebenfalls in der Therapie verwendete Calcium-Gluconat scheint bei einem 10-fachen Uberschuß die Calcium-Resorption nicht zu verschlechtern, allerdings auch nicht zu verbessern.

Bei Erhöhung des Calcium-Angebotes auf das 10-fache vermindert sich die Calcium-Resorption auf die Hälfte. Dies scheint Ausdruck einer Sättigung des Calcium-resorbierenden Systems zu sein. Dafür spricht auch, daß es in diesen Versuchen wegen der gleichzeitigen Verminderung der spezifischen Aktivität des angebotenen ^{45}Ca nicht möglich war, ^{45}Ca in der Darmmucosa nachzuweisen. Diese kann also nur eine begrenzte Kapazität zur Aufnahme von Calcium besitzen. Das Fehlen einer Beeinflussung der Phosphat-Resorption durch das hohe Calcium-Angebot spricht zusätzlich gegen eine Kopplung zwischen Phosphat- und Calcium-Resorption.

Eine 10-fache Erhöhung des Phosphat-Angebotes verminderte ebenfalls die Calcium-Resorption. Dies ist aber nicht verwunderlich, da bereits die Diffusionsversuche gezeigt hatten, daß eine Erhöhung der Phosphat-Konzentration den physikochemischen Zustand des Calciums beeinflußt, so daß die Diffusionsgeschwindigkeit herabgesetzt war.

Bei Alkalimetallen (PFLEGER, FORTH und RUMMEL, 14) und bestimmten Arzneistoffen (KAUSCH, 17) konnte gezeigt werden, daß sie bei erhöhter Wasser-Resorption in gesteigertem Maße resorbiert werden. Zwei Ursachen können für diese Beobachtung herangezogen werden. Bei einem nicht gesättigten Transportsystem sollte durch Erhöhung der Konzentration infolge der Wasser-Resorption das Angebot an Substrat für dieses Transportsystem steigen, was eine erhöhte Resorptionsrate zur Folge haben müßte. Weiterhin könnte das Wasser selbst die gelösten Stoffe mitnehmen, was als "solvent drag" bezeichnet wird (USSING, 15).

Die in Tabelle 4 wiedergegebenen Untersuchungen zeigten aber, daß bei Erhöhung der Wasser-Resorption die in 60 Minuten resorbierte Calcium-Menge gleich

bleibt, obwohl bei Angebot des Calcium in reiner NaCl-Lösung die Calcium-Konzentration nach 60 Minuten auf das Dreifache gegenüber reiner Cholin-Cl-Lösung gestiegen ist. Die gleichzeitig gemessene Phosphat-Resorption zeigt dagegen mit der Wassernettoverschiebung aus dem Darmlumen ins Blut eine Zunahme.

Diese Befunde können nur so gedeutet werden, daß das Calcium durch ein Transportsystem begrenzter Kapazität aus dem Darmlumen resorbiert wird, während für Phosphat ein anderes, bei einem Angebot von 10 µMol/ml Phosphat noch nicht gesättigtes Transportsystem verantwortlich ist, das Phosphat zum Teil in die Mucosazelle, zum Teil ins Blut transportiert.

Die beim Studium der Phosphat-Resorption erhaltenen Ergebnisse sprechen nicht gegen die Möglichkeit, daß Phosphat zunächst in die Mucosazelle diffundiert und dort sofort in Adenosintriphosphorsäure überführt wird, wie es für den Erythrozyten von PFLEGER, SEIFEN und RUMMEL (18) nachgewiesen und später von GERLACH, DEUTIKE und DUHM (19) bestätigt wurde. Die lange Verweildauer des Phosphates in der Darmwand - nur durch eine lange Verweildauer ist zu erklären, daß mehr als

50 % des resorbierten Phosphates nach 60 Minuten in der Darmwand gefunden werden - spricht dagegen, daß der ins Blut übergetretene Phosphat-Anteil überhaupt durch die Mucosazelle hindurch ins Blut gelangt ist. Sie läßt vermuten, daß Phosphat die zwischen Darmlumen und Blut vorhandene Barriere auch auf einem anderen Weg, vornehmlich durch Diffusion überwinden kann. So ließe sich jedenfalls der für die Phosphat-Resorption nachgewiesene Solvent Drag-Effekt am einfachsten deuten.

Zusammenfassung :

In der vorliegenden Arbeit wird zunächst die Diffusionsgeschwindigkeit von Calcium und Phosphat mit dem Alkalimetall Rubidium verglichen. Calcium diffundiert etwa 2,3 Mal langsamer als Rubidium und etwa gleich schnell wie Phosphat. In Serum und in Anwesenheit eines Phosphatüberschusses, von Zitronensäure und Äthylendiamintetraessigsäure ist die Diffusionsgeschwindigkeit von Calcium vermindert, während die Inhaltsstoffe der Tyrodelösung und Gluconsäure die Calciumdiffusion nicht beeinflussen.

An der abgebundenen Dünndarmschlinge der Ratte wird gezeigt, daß die Calcium-Resorption vom Calcium-Angebot abhängt, und bei einer zehnfachen Erhöhung des Phosphatangebotes um ein Drittel absinkt. Die geprüften Komplexbildner haben dabei entweder keinen Einfluß auf die Calciumresorption, wie Gluconsäure, oder setzen sie herab, wie Äthylendiamintetraessigsäure, Milchsäure, Phosphorsäure oder Zitronensäure.

Wird Calcium nicht in isotoner Cholin-Cl-Lösung, sondern in isotoner Kochsalzlösung angeboten, so kommt es zu einer Wassernettoverschiebung aus dem Darmlumen ins Blut. Die Calciumkonzentration steigt dadurch auf das Dreifache an. Im Gegensatz zum Phosphat wird aber mit der Wasserresorption nicht vermehrt Calcium resorbiert.

VI. LITERATUR

1. TELFER, S. V.
   Quart. J. Med. 16, 45 - 62 (1922)

2. KARELITZ, S. and SHOHL, A. T.
   J. biol. Chem. 73, 665 - 677 (1927)

3. HARRISON, D. C. and MELLANBY, E.
   Bioch. J. 33, 1660 - 1680 (1939)

4. VAUGHAN, O. W. and FILER, L. J.
   J. Nutr. 71, 10 - 14 (1960)

5. WASSERMAN, R. H., COMAR, C. L., SCHOOLEY, J. C. and LENGEMANN, F. W.
   J. Nutr. 62, 367 - 376 (1957)

6. McCANCE, R. A., WIDDOWSON, E. M. and LEHMAN, H.
   Biochem. J. 36, 686 - 691 (1942)

7. SCHACHTER, D., DOWDLE, E. B. and SCHENKER, H.
   Amer. J. Physiol. 198, 263 - 268 (1960)

8. SCHACHTER, D., DOWDLE, E. B. and SCHENKER, H.
Amer. J. Physiol. 198, 275 - 279 (1960)

9. WASSERMAN, R. H.
Proc. Soc. exp. Biol. NY 104, 92 - 95 (1960)

10. HARRISON, H. E. and HARRISON, H. C.
Amer. J. Physiol. 199, 265 - 271 (1960)

11. HARRISON, H. E. and HARRISON, H. C.
J. biol. Chem. 188, 83 - 89 (1951)

12. NICOLAYSEN, R.
Acta physiol. scand. 22, 260 - 266 (1951)

13. MOORE, J. H. and TYLER, C.
Brit. J. Nutr. 9, 81 - 93 (1955)

14. FORTH, W., PFLEGER, K. und RUMMEL, W.
Radioisotope in der Gastroenterologie, S. 191
(1967). Schattauer-Verlag, Stuttgart.

15. USSING, H. H.
Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, Bd. 13,
S. 51 (1960). Springer-Verlag, Heidelberg.

16. PFLEGER, K.
unveröffentlichte Untersuchungen

17. KAUSCH, O.
Dissertation Universität des Saarlandes 1969

18. PFLEGER, K. und SEIFEN, E.
Biochem. Z. 335, 595 - 605 (1962)

19. GERLACH, E., DEUTIKE, B. und DUHM, B.
Arch. Ges. Physiol. 280, 243 (1964)

Herrn Professor Dr. Karl PFLEGER danke ich herzlich für die Problemstellung und seine hilfsbereite Unterstützung.
Ebenfalls gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Walter RUMMEL für die mir erteilten Auskünfte und Ratschläge.

Lebenslauf

Am 24. März 1937 wurde ich, Wernher Theobald, als erstes von drei Kindern des Oberlandwirtschaftsrates Wilhelm Theobald und seiner Ehefrau Hildegard geb. Schmidt in Rodalben bei Pirmasens geboren.

Die Schule besuchte ich in Speyer und Pirmasens. Nach dem Abitur am Leibnitzgymnasium studierte ich in München, Erlangen und Homburg/Saar Zahnheilkunde. Im Sommer 1966 legte ich das Staatsexamen ab. Anschließend war ich bei verschiedenen Zahnärzten als Assistent tätig. Im Dezember 1968 gründete ich in Pirmasens eine eigene Praxis.